

Литература

1. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов / О. А. Воробьёва [и др.] // Проблемы репродукции. – 2005. – Т. 6. – С. 56–62.
2. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов. – СПб., 2007. – 640 с.
3. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: a meta-analysis / A. S. Setti [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2014. – Vol. 183. – P. 96-103. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.10.008
4. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection? / M. Franzek [et al.] // 98 Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2015. – Vol. 32, № 5. – P. 771-779. DOI: 10.1007/s10815-015-0462-x
5. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных / А. П. Студенцов [и др.]. – Москва : КолосС, 2011. – 440 с.
6. Биологические показатели спермы быков-производителей in vitro / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2021. – Вып. 24, ч. 1. – С. 70-77.
7. Ball, P. J. H. Reproduction in cattle / P. J. H. Ball, A. R. Peters. – 3th ed. – Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2004. – 250 p.
8. Показатели подвижности спермы быков на разных этапах подготовки к оплодотворению in vitro / А. И. Ганджа [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр., посвящ. памяти д-ра с.-х. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси Василия Михайловича Голушко. – Жодино, 2021. – Т. 56, ч. 1: Генетика, разведение, селекция, биотехнология размножения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. – С. 21-28.
9. Показатели подвижности спермиев быков-производителей / А. И. Ганджа [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. по материалам XXIV Междунар. науч.-практ. конф. к 70-летию образования университета, г. Гродно, 14 мая, 20 мая 2021 г. – Гродно : ГГАУ, 2021. – С. 103-104.
10. Фёдорова, И. Д. Принципы отбора сперматозоидов по морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам для проведения внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит / И. Д. Федорова, Е. М. Шильникова, А. М. Гзгзян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, вып. 3. – С. 123-131.

Поступила 11.01.2023 г.

УДК 636.2.082.31:591.391

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, В.П. СИМОНЕНКО, А.И. ГАНДЖА,
И.В. КИРИЛЛОВА, Е.Д. РАКОВИЧ, Н.В. ЖУРИНА,
М.А. КОВАЛЬЧУК

УСЛОВИЯ ПОДГОТОВКИ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ИНЪЕКЦИИ

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В статье представлены данные работы, цель которой заключалась в

изучении условий подготовки сперматозоидов быка для проведения интрацитоплазматической инъекции. В результате исследований определены условия успешной подготовки заморожено-оттаянной спермы быков голштинизированной породы для проведения интрацитоплазматической инъекции. Установлено, что использование в культуральной среде для капацитации на основе Тиродэ крезацина в концентрации 3 мг/мл или рекомбинантного человеческого лактоферрина в концентрации 1 мг/мл обеспечивает отсутствие после завершения процедуры капацитации у 100 % спермиев проксимальных капель, у 94,6-95,2 % спермиев дистальных капель, у 99,6-100 % изогнутых хвостиков, а также получение 85,5-86,5 % морфологически нормальных спермиев без дефектов головки, тела и хвостика и показатели общей подвижности гамет на уровне 68-77 % с сохранением оптимальных параметров скорости, траектории движения и колебания.

Ключевые слова: сперматозоид, капацитация, подвижность, скорость, траектория, амплитуда, тератозооспермия.

L.L. LETKEVICH, V.P. SIMONENKO, A.I. GANDZHA,
I.V. KIRILLOVA, E.D. RAKOVICH, N.V. ZHURINA,
M.A. KOVALCHUK

CONDITIONS FOR PREPARATION OF BOVINE SPERMATOOZOA FOR INTRACYTOPLASMIC INJECTION

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

This paper presents the data of the work, the purpose of which was to study the conditions for preparation of bovine spermatozoa for intracytoplasmic injection. As a result of the research, the conditions for successful preparation of frozen-thawed semen of Holsteinized bulls for intracytoplasmic injection were determined. It has been established that the use of a culture medium for capacitation based on Tyrodé's solution containing cresacin at a concentration of 3 mg/ml or recombinant human lactoferin at a concentration of 1 mg/ml ensures the absence of proximal drops in 100% of spermatozoa after capacitation, distal drops in 94.6-95.2% of spermatozoa, curved tails in 99.6-100% of spermatozoa, as well as obtaining 85.5-86.5% of morphologically normal spermatozoa without defects in the head, body and tail, and overall gamete motility indices at the level of 68-77%, while maintaining the optimal parameters of speed, trajectory and amplitude.

Keywords: spermatozoon, capacitation, motility, speed, trajectory, amplitude, teratozoospermia.

Введение. Качество половых клеток является одним из наиболее важных факторов развития полноценного зародыша и определения вероятности успеха во вспомогательных репродуктивных технологиях. Трудно получить эмбрионы хорошего качества, а чаще это и вовсе не

представляется возможным, из гамет плохого качества или плохо подготовленных к процедуре оплодотворения. Получение же ограниченного количества жизнеспособных спермиев даже при создании оптимальных условий капацитации решается внедрением технологии интрацитоплазматической инъекции, когда для оплодотворения одной яйцеклетки используется один сперматозоид [1, 2, 3].

Имеются предположения, что изменённая морфология сперматозоидов препятствует правильному слиянию цитоплазмы яйцеклетки и сперматозоида либо ведёт к рецепторной дисфункции. В литературе существуют указания на корреляцию между нарушениями в организации ядер у морфологически аномальных сперматозоидов и их способностью к оплодотворению [4, 5, 6]. Присутствие бактериальных штаммов приводит к увеличению доли аннексина (некротического маркера) и процентного содержания погибших сперматозоидов [7].

В этой связи цель работы заключалась в изучении условий подготовки сперматозоидов быка для проведения интрацитоплазматической инъекции.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в 2022 году. Замороженную сперму быков-производителей голштинизированной породы оттаивали в водяной бане, подвергали исследованию либо помещали в 1 мл среды для капацитации и оставляли на 1 час в CO₂-инкубаторе для проведения *swim up* процедуры. Для определения влияния условий капацитации на качество спермы в среду капацитации добавляли крезацин в концентрации 3 мг/мл или рекомбинантный человеческий лактоферрин (рчЛФ) в концентрации 1 мг/мл или эпибрасинолид в концентрации 2×10^{-8} моль/л.

Для определения количества морфологических аномалий (дефекты формы, размеров, деформации и др.) спермиев быков до и после капацитации каплю спермы после специальной подготовки исследовали под микроскопом (увеличение в 400 раз), подсчитывали 200 клеток, учитывая отдельно нормальные и патологические сперматозоиды [8]. Определяли индекс тератозооспермии [9]. Нормой считаются значения в интервале от 1,0 до 1,6.

Анализ биологических параметров жизнеспособности спермы проводили с помощью системы Sperm Vision™ Professional. Оценку проводили по следующим показателям: концентрация сперматозоидов; общая подвижность сперматозоидов, прямолинейно-поступательное движение; расстояние кривой пути; расстояние среднего пути; расстояние прямой пути; криволинейная скорость; средняя скорость по траектории; прямолинейная скорость; линейность; прямолинейность; колебание;

частота биения головки; амплитуда бокового смещения головки и изменение количества спермиев с различными аномалиями их развития: наличие проксимальных капель (аномалии головки спермия), наличие дистальных капель (аномалии тела спермия), наличие изогнутых, либо изломанных хвостиков (аномалии хвостика спермии) [10].

Результаты эксперимента и их обсуждение. Результаты изучения влияния условий капацитации на качество спермы быков вне организма представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние условий капацитации на качество спермы быков вне организма

Показатель, единица измерения	Этап оценки спермы	Концентрация, млрд/мл	Отсутствие аномалий, млн/мл-%		
			проксимальных капель	дистальных капель	изогнутых хвостиков
Контроль	после капацитации	0,0550	47,315-99,0	21,101-95,2	40,562-97,0
	после оплодотворения	0,0410	40,500-99,0	23,223-97,7	40,110-98,0
Крезацин, 3 мг/мл	после капацитации	0,0421	42,114-100	39,827-94,6	41,931-99,6
	после оплодотворения	0,0564	56,431-100	49,406-87,6	56,421-100
рчЛФ, 1 мг/мл	после капацитации	0,0143	14,308-100	13,613-95,2	14,307-100
	после оплодотворения	0,0675	67,298-99,7	65,745-97,4	67,521-100
Эпибрасинолид, 2×10^{-8} моль/л	после капацитации	0,0154	15,472-100	14,722-95,6	15,440-96,0
	после оплодотворения	0,0187	18,760-99,0	15,989-85,5	18,703-97,0

Анализ концентрации спермиев в 1 мл показал, что имеются незначительные отличия между опытными группами в сравнении с контролем. Так, если в контроле после оплодотворения концентрация спермиев снизилась на 25,5 п. п. по сравнению с данными после капацитации, то использование крезацина и лактоферрина поменяло картину на противоположную – после оплодотворения количество спермиев установлено более чем после капацитации на 25,4 и 78,8 п. п. соответственно. Использование эпибрасинолида подтвердило аналогичную

тенденцию: наблюдался рост на 17,7 п. п. Наличие проксимальных капель не имело существенных различий как между опытными группами и контролем, так и внутри опытных групп. Значение показателя находилось в пределах 99,0-100 %. Отсутствие дистальных капель наблюдалось после капацитации у 99,0 % клеток в контроле и у 100 % клеток в трёх опытах. После оплодотворения цифровые значения этого показателя составили 99,0 % в контроле, 100 % с крезацином и эпибрасинолидом и 99,7 % – с рчЛФ. Не замечено изогнутых хвостиков у 97,0 % спермиев в первой части эксперимента в контроле, в опыте с крезацином – у 99,6 %, с лактоферрином – у 100 %, эпибрасинолидом – у 96,0 % клеток. После проведение процедуры оплодотворения вне организма неожиданно незначительно изменился данный показатель в плане улучшения: в контроле – до 98,0 %, в трёх опытных группах – до 100 %, 100 и 97,0 % соответственно.

На следующем этапе исследований нами изучено влияние условий капацитации на морфологические показатели, характеризующие жизнеспособность спермиев быков-производителей, в частности наличие морфологических аномалий гамет быков (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние условий капацитации на морфологические показатели спермы быков

Показатель, ед. измерения	Этап оценки спермы	Нормальные спермии, п-%	Дефекты спермиев, п-%			Индекс тератозооспермии
			головки	тела	хвостика	
Контроль	после капацитации	167-83,5	13-39,4	10-30,3	16-48,5	1,2
	после оплодотворения	167-83,5	13-39,4	11-33,3	16-48,5	1,3
Крезацин, 3 мг/мл	после капацитации	173-86,5	10-37,0	9-33,3	18-66,7	1,2
	после оплодотворения	180-90,0	5-25,0	6-30,0	9-45,0	1,2
рч ЛФ, 1 мг/мл	после капацитации	166-83,0	14-41,2	12-35,3	18-52,9	1,3
	после оплодотворения	167-83,5	12-36,4	10-30,3	24-72,7	1,4
Эпибрасинолид, 2×10^{-8} моль/л	после капацитации	164-82,0	14-38,9	12-33,3	25-69,4	1,4
	после оплодотворения	163-81,5	17-45,9	15-40,5	26-70,3	1,6

Нормальных спермиев в процентном соотношении после капацитации и после оплодотворения в контроле получено по 83,5 %, в трёх

опытных группах – 86,5 и 90,0 %, 83,0 и 83,5 %, 82,0 и 81,5 % соответственно. Дефекты головок спермиев наблюдались у 39,4 % клеток контроля и 37,0 и 25,0 %, 41,2 и 36,4 %, 38,9 и 45,9 % опытных групп соответственно. Анализ дефектов тела выявил тенденцию роста их количества после оплодотворения в контроле с 30,3 до 33,3 %. В опытах наблюдались незначительные изменения с 33,3 до 3,0 %, с 35,3 до 30,3 %. И лишь в опыте с эпибрассинолидом отмечен рост с 33,3 до 40,5 %. Существенных изменений в ходе процедуры капацитации и оплодотворения в дефектах хвостиков спермиев не выявлено: контроль составил по 48,5 %, экспериментальные группы – 66,7 и 45,0 %, 52,9 и 72,7 %, 69,4 и 70,3 %. Индекс тератозооспермии в контроле составил 1,2 и 1,3, в опытах –1,2-1,2; 1,3-1,4 и 1,4-1,6 соответственно. Из представленных данных видно, что использование эпибрассинолида негативно сказалось на данном показателе.

Анализ показателей движения спермиев быков вне организма в зависимости от используемых биостимуляторов показал значительное снижение этих характеристик после оплодотворения в сравнении с аналогичными после капацитации, что вполне закономерно и объясняется функциональными и временными факторами (таблица 3). Однако между опытными группами наблюдались существенные отличия, как между ними, так и контролем. Если в контроле снижение общей подвижности спермиев через 18-20 часов культивирования составило 7,7 % от показателя после капацитации, то с применением крезацина – 14,3 %, лактоферрина – 14,7 %, а эпибрассинолида – 4,8 % соответственно.

Таблица 3 – Влияние условий капацитации на показатели движения спермиев быков вне организма

Показатели	Контроль		Крезацин, 3 мг/мл		рЧЛФ, 1 мг/мл		Эпибрассинолид, 2×10^{-8} моль/л	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Общая подвижность, %	65,0	5,0	77,0	11,0	68,0	10,0	63,0	3,0
Подвижность прямолинейно-поступательная, %	45,0	8,0	47,0	17,0	39,0	9,0	22,0	4,0
Расстояние кривой (DCL), мкм	24,68	4,22	35,21	6,1	33,69	12,15	20,60	3,10
Расстояние среднего пути (DAP), мкм	17,98	8,62	19,10	11,27	18,61	10,69	12,75	4,46
Расстояние прямой (DSL), мкм	9,47	2,92	8,88	2,12	14,24	3,98	9,80	1,21

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Криволинейная скорость (VCL), мкм/сек.	41,71	18,90	48,91	25,19	74,21	35,62	51,85	19,35
Средняя скорость по траектории (VAP), мкм/сек.	41,36	17,02	46,19	18,71	41,15	15,23	31,79	11,65
Прямолинейная скорость (VSL), мкм/сек.	27,21	11,41	23,25	9,11	31,52	12,75	24,76	9,38
Линейность (LIN = VSL/VCL), %	46,0	17,0	49,0	22,00	41,0	25,0	47,0	19,0
Прямолинейность (STR=VSL/VAP), %	73,0	24,0	88,0	21,0	75,0	27,0	77,0	19,0
Колебание (WOB = VAP/VCL), %	55,0	17,0	57,0	13,0	54,0	19,0	61,0	9,0
Частота биения головки (BCF), биений/сек.	23,30	5,60	25,95	6,00	29,43	7,30	29,35	7,80
Амплитуда бокового смещения головки (ALH), мкм	3,61	1,29	4,18	1,52	2,88	1,72	2,36	1,50

Примечание: * 1 – после капацитации, 2 – после оплодотворения

Прямолинейно-поступательная подвижность спермиев изменялась аналогично и в контроле составила 17,8 %, с крезацином – 36,1 %, с лактоферрином – 23,1 %, с эпибрасинолидом – 18,2 % от цифровых значений показателя после капацитации. Такой показатель как расстояние кривой в контроле снизился с 24,68 до 4,22 мкм и в опытных с 35,21 до 6,1 мкм, с 33,69 до 12,15 мкм, с 20,6 до 3,1 мкм соответственно. Расстояние среднего пути, пройденное сперматозоидом в поле зрения, изменилось в контроле с 17,98 до 8,62 мкм, опытных группах – с 19,10 до 11,27 мкм, с 18,61 до 10,69 мкм, с 12,75 до 4,46 мкм соответственно. Расстояние прямой в контроле снизилось с 9,47 до 2,92 мкм, в опытных – с 8,88 до 2,12 мкм, с 14,24 до 3,98 мкм, с 9,8 до 1,21 мкм соответственно.

Криволинейная скорость движения спермиев наблюдалась самая низкая в контроле, как после капацитации, так и после завершения оплодотворения, – 41,71 и 18,90 мкм/сек. соответственно. В опыте с лактоферрином отмечены самые высокие значения показателя – 74,21 и 35,62 мкм/сек., с крезацином – 48,91 и 25,19 мкм/сек., а с эпибрасинолидом – 51,85 и 19,35 мкм/сек. соответственно. Средняя скорость движения спермиев по траектории в контроле составила 41,36 мкм/сек. после капацитации и 17,02 мкм/сек. после оплодотворения, с использованием крезацина – 46,19 и 18,71 мкм/сек., лактоферрина – 41,15 и 15,23 мкм/сек., а эпибрасинолида – 31,79 и 11,65 мкм/сек. Ситуация с

прямолинейной скоростью движения гамет выглядела следующим образом: контроль – 27,21 и 11,41 мкм/сек., с крезацином – 23,25 и 9,11 мкм/сек., с лактоферрином – 31,52 и 12,75 мкм/сек. и с эпибрасинолидом – 24,76 и 9,38 мкм/сек. Такой показатель, как линейность в контроле составил 46,0 и 17,0 %, в опытных группах – 49,0 и 22,0 %, 41,0 и 25,0 %, 47,0 и 19,0 % соответственно. Прямолинейность в контроле – 73,0 и 24,0 %, в опытных – 88,0 и 21,0 %, 75,0 и 27,0 %, 77,0 и 19,0 % соответственно. Показатель «колебание» в контроле – 55,0 и 17,0 %, в опытных – 57,0 и 13,0 %, 54,0 и 19,0 %, 61,0 и 9,0 % соответственно. Частота биения головки спермиев в контроле составила 23,30 и 5,60 биений/сек., в опытных – 25,95 и 6,00 биений/сек., 29,43 и 7,30 биений/сек., 29,35 и 7,80 биений/сек. соответственно. Анализ показателя бокового смещения головки спермия выявил следующую картину: контроль – 3,61 и 1,29 мкм, с крезацином – 4,18 и 1,52 мкм, с лактоферрином – 2,88 и 1,72 мкм, с эпибрасинолидом – 2,36 и 1,50 мкм соответственно.

Заключение. Установлены условия успешной подготовки заморожено-оттаянной спермы быков голштинизированной породы для проведения интрацитоплазматической инъекции, заключающиеся в использовании в культуральной среде для капацитации на основе Тироде крезацина в концентрации 3 мг/мл или рекомбинантного человеческого лактоферрина в концентрации 1 мг/мл, обеспечивающие отсутствие после завершения процедуры капацитации у 100 % спермиев проксимальных капель, у 94,6-95,2 % спермиев дистальных капель, у 99,6-100 % изогнутых хвостиков; получение 85,5-86,5 % морфологически нормальных спермиев без дефектов головки, тела и хвостика; показателей общей подвижности гамет на уровне 68-77 % с сохранением оптимальных параметров скорости, траектории движения и колебания. Данные показатели могут служить морфологическими и функциональными маркерами при селекции спермиев в клеточных репродуктивных технологиях и, в частности, технологии интрацитоплазматической инъекции.

Литература

1. Цитологические, цитогенетические показатели гамет, физиологическое состояние яичников коров и жизнеспособность полученных эмбрионов / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2020. – Вып. 23, ч. 1. – С. 13-21.
2. Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows / F. Magata [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2019. – Vol. 81(1). – P. 84–90.
3. Kolbe, T. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) / T. Kolbe, W. Holtz // Animal Reproduction Science. – 2000. – Vol. 64. – P. 97–101.
4. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов / О. А. Воробьева [и др.] // Проблемы репродукции. – 2005. – Т. 6. – С. 56–62.
5. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов. – СПб., 2007. – 640 с.

6. Фертильность сперматозоидов и состояние хроматина: методы контроля (обзор) / В. А. Багиров [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 2. – С. 3-13.

7. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection? / M. Franzek [et al.] // 98 Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2015. – Vol. 32, № 5. – P. 771-779. DOI: 10.1007/s10815-015-0462-x

8. Ball, P. J. H. Reproduction in cattle / P. J. H. Ball, A. R. Peters. – 3th ed. – Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2004. – 250 p.

9. Клещев, М. А. Оценка морфологических аномалий сперматозоидов у быков – производителей / М. А. Клещев, В. Л. Петухов, Л. В. Осадчук // Эффективное животноводство. – 2018. - № 3. – С. 69-71.

10. Биологические показатели спермы быков-производителей in vitro / В. П. Симоненко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. – Горки : БГСХА, 2021. – Вып. 24, ч. 1. – С. 70-77.

Поступила 11.01.2023 г.

УДК 636.13:575.174.015.3

А.Н. РУДАК, А.И. ГЕРМАН, Ю.И. ГЕРМАН, М.А. ГОРБУКОВ

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДНК ЛОШАДЕЙ ВЕРХОВЫХ ПОРОД С ИХ РАБОТОСПОСОБНОСТЬЮ

*Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В настоящее время внедрение в практику разведения лошадей верховых пород новых разработок на основе ДНК-тестирования является актуальным. Их использование способствует не только росту показателей воспроизводства, но и решению сложнейшей задачи тиражирования и сохранения уникальных генотипов лошадей, отвечающих возросшим требованиям их многогранного использования в различных дисциплинах конного спорта. Статья посвящена изучению связи полиморфизма микросателлитных локусов ДНК лошадей верховых пород с их работоспособностью. Установлено, что лошади верховых пород с оценкой спортивных качеств выше 7,5 баллов характеризуются достоверно более высокой частотой встречаемости аллелей ASB17^G, ASB23^I, CA425^I, HMS2^M, HMS2^H, HMS3^I и HMS3^Q в соответствующих микросателлитных локусах. Также выявлен также ряд аллелей снижающих спортивные качества лошадей. Полученные данные могут быть использованы в качестве маркеров для отбора перспективных лошадей для конного спорта.

Ключевые слова: лошади верховых пород, работоспособность, локусы микросателлитов ДНК, частота аллеля.